Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen
Wilhelms-Universität / Münster (Westf.)
Direktor: Prof. Dr. med. et phil. H. Freund.

Ueber die sensibilisierende Wirkung des Physostigmins.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität zu Münster (Westf.)

vorgelegt von
Ludger Müller
aus Emsdetten (Westf.)

Verlagsanstalt Heinr. & J. Lechte, Emsdetten (Westf.)

1935

Aus dem Pharmakologischen Institut der Westfälischen
Wilhelms-Universität / Münster (Westf.)
Direktor: Prof. Dr. med. et phil. H. Freund.

Ueber die sensibilisierende Wirkung des Physostigmins.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität zu Münster (Westf.)

vorgelegt von
Ludger Müller
aus Emsdetten (Westf.)

74 43

Verlagsanstalt Heinr. & J. Lechte, Emsdetten (Westf.)
1935

Dekan: Prof. Dr. Klinge
Referent: Prof. Dr. med. et phil. H. Freund.
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Febr. 1935.

Gedruckt mit Genehmigung der Hohen med. Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Aus dem pharmakologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster i. Westf.
(Direktor Professor Dr. H. Freund).

Ueber die sensibilisierende Wirkung des Physostigmins[1])

von

Ludger Müller.

Der Nachweis von Acetylcholin in Blut, Gewebe und Extrakten aus ihnen ist mit einer Reihe von Schwierigkeiten verbunden. Acetylcholin ist nicht nur außerordentlich alkali-empfindlich, sondern es wird auch durch die Gewebeesterasen rasch inaktiviert. Die Bestimmung der biologisch zu erwartenden Acetylcholinmengen ist nur am lebenden Testobjekt möglich, wodurch die Schwierigkeiten noch erhöht werden. Dazu kommt, daß Acetylcholin nicht der einzige Stoff ist, der im Blut, Gewebe und Organextrakten vorkommen kann. Organextrakte stellen immer pharmakologische Gemische da, deren Auswertung zu den schwierigsten Aufgaben der pharmakologischen Analyse gehört.

Einen wesentlichen Fortschritt auf diesem Gebiete bildet deshalb die Entdeckung Loewi's[2]), daß die Inaktivierung des Acetylcholins in Blut und Gewebe durch eine Esterase bedingt ist, deren Wirkung durch Physostigmin ausgeschaltet wird. Das mit Physostigmin vorbehandelte Testobjekt ist seither häufig zum Nachweis von Acetylcholin benutzt worden. Die klassischen Versuche Loewi's sind an isolierten Froschherzen vorgenommen worden. Aber gerade dieses Organ soll nach Chang und Gaddum[3]), Kahlson[4]) und Gollwitzer-Meier[5])

---

[1]) Die Arbeit wurde unter der Leitung des Herrn Professor Dr. K. Zipf im Sommersemester 1933 und in den Herbstferien 1933 fertiggestellt.

[2]) O. Loewi, Die Naturwissenschaften 14. Jg. 994, (1926).

[3]) H. C. Chang, J. H. Gaddum, Journ. of physiol. 79, 255 (1933).

[4]) G. Kahlson, Klin.Wo. 26, 1015 (1933).

[5]) Kl. Gollwitzer-Meier u. E. Krüger, Arch. exp. Pathol. 176, 642 (1934).

zum Nachweis von Acetylcholin in Organextrakten nicht geeignet sein, weil die Empfindlichkeit gegenüber diesem Stoff durch andere Begleitstoffe herabgesetzt wird. Dagegen soll nach Minz[6]) die Kontraktion des mit Physostigmin sensibilisierten Rückenmuskel des Blutegels eine spezifische Testreaktion für Acetylcholin darstellen. Diese Spezifität wird allerdings eingeschränkt durch die Feststellung, daß Cholin[7]), der R-Stoff von Chang und Gaddum[2]) und Kaliumionen[8]), also Stoffe, mit deren Gegenwart in Organextrakten immer gerechnet werden muß, am physostigminisierten Blutegelpräparat acetylcholinartige Wirkung entfalten können.

Alle diese Tatsachen weisen auf die Möglichkeit hin, daß die sensibilisierende Wirkung des Physostigmins nicht nur für Acetylcholin, sondern auch für andere Substanzen gilt. Zur Klärung dieser Frage wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

I.

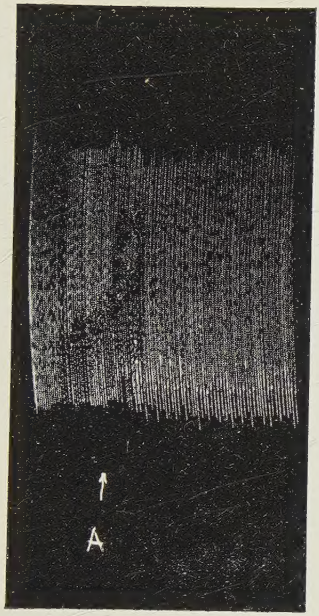
Die Untersuchungen über die Schutzwirkung des Physostigmins mußten ausgehen von dem Grundversuch Loewi's über die Hemmung der Vagusstoff- bezw. Acetylcholinspaltung. Als Testobjekt wurde deshalb das Froschherz genommen. Bei der gewählten Versuchsanordnung fielen die gegen dieses Testobjekt geltend gemachten Bedenken weg.

Methodisch wurde in folgender Weise verfahren: In einem Ansatz 1 wurden 10 ccm einer Lösung Acetylcholin 1:1000 mit 1 ccm frischem Kaninchenblutserum vermischt und nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 1 ccm einer Physostigminlösung 1 : 500 versetzt. — In einem Ansatz II wurden 10 ccm derselben Acetylcholinlösung 1:1000 mit 1 ccm frischem Kaninchenserum und sofort auch mit 1 ccm Physostigminlösung 1:500 versetzt und ebenfalls 1 Stunde stehen gelassen. Beide Ansätze wurden nunmehr mit Kaltblüterringerlösung auf eine geeignete Konzentration verdünnt und am isolierten Froschherz pharmakologisch untersucht. Das Ergebnis war folgendes:

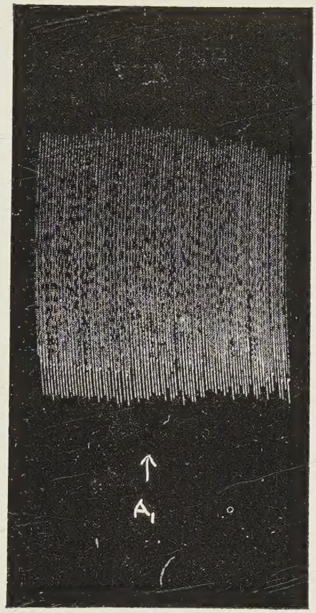
Bei der Durchströmung des Froschherzens mit einer Acetylcholinverdünnung 1:1 Milliarde konnte weder bei Ansatz I noch bei Ansatz II eine Wirkung festgestellt werden (Kurve I und II). Dagegen trat bei einer Acetylcholinkonzentration 1:100 Millionen die erwartete Wirkung auf (Kurve 3 und 4). Ansatz I, in dem Acetylcholin nicht durch Physo-

---

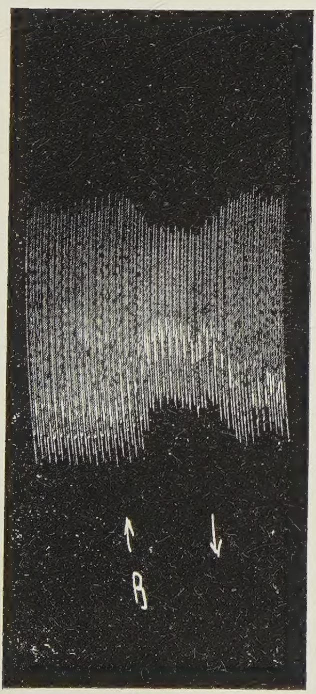
[6]) B. Minz, Arch. exp. Pathol. **168**, 292 (1932).
[7]) W. Feldberg u. P. Rosenfeld, Pflügers Arch. **232**, 212, (1933).
[8]) Kl. Goldwitzer-Meier a.a.O.



Kurve 1



Kurve 2



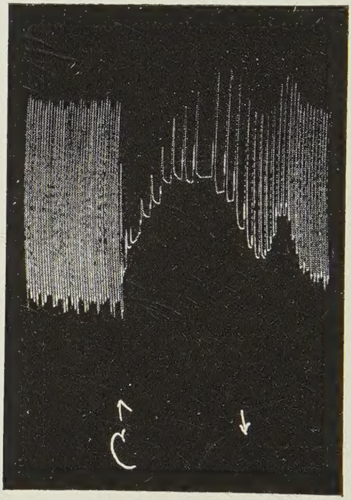
Kurve 3

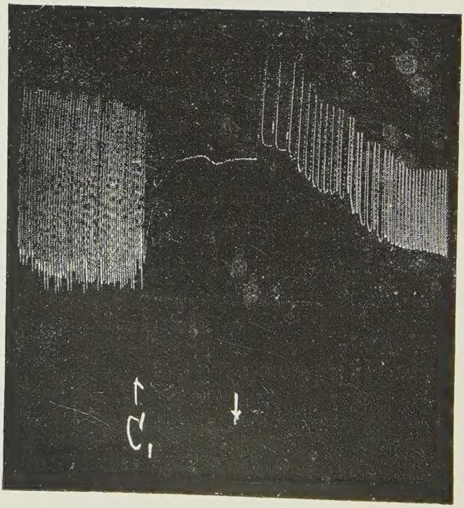


Kurve 4

stigmin gegen die Serumwirkung geschützt war, wirkte wesentlich schwächer als Ansatz II, dem Physostigmin sofort zugesetzt war. Selbst bei der hohen Acetylcholinkonzentration 1:10 Millionen konnte, wie aus Kurve 5 und 6 hervorgeht, die Schutzwirkung des Physostigmins gegen-

Kurve 5



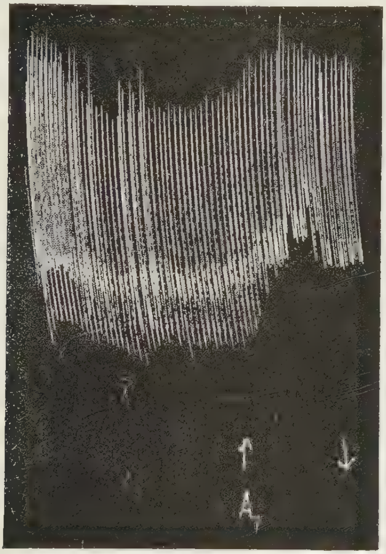


Kurve 6

über Kaninchenserum festgestellt werden. Eine zweite Versuchsserie hatte dasselbe Ergebnis. Schon bei einer Acetylcholinverdünnung 1:1 Milliarde liesch sich hier die unterschiedliche Wirkung des geschützten und ungeschützten Ansatzes feststellen (Kurve 7 und 8). Noch deutlicher war der Unterschied bei der Verdünnung 1:100 Millionen (Kurve 9 und 10).



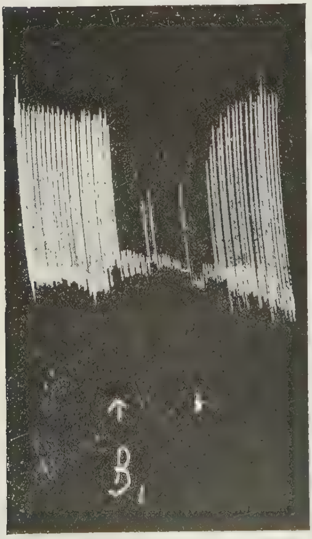
Kurve 7



Kurve 8



Kurve 9

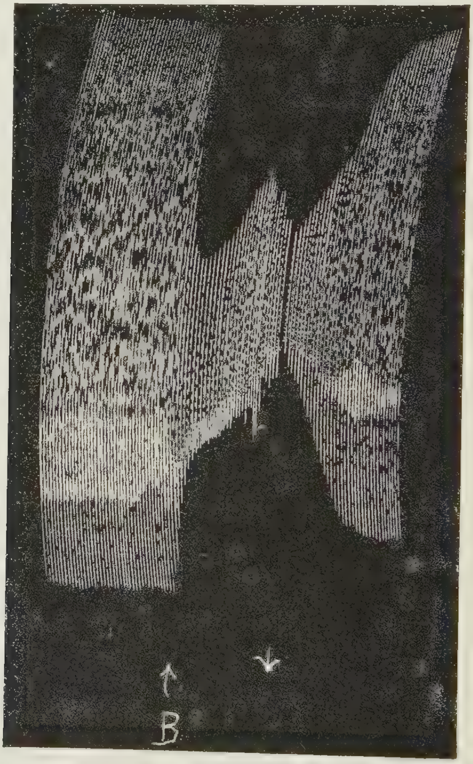


Kurve 10

Die schützende Wirkung des Physostigmins gegenüber der acetylcholinspaltenden Serumwirkung konnte demnach bestätigt werden.

II.

Nach Loewi[9]) wird die Zerstörung des Vagusstoffes bezw. des Acetylcholins bewirkt durch eine Esterase, deren Wirksamkeit durch Erhitzen auf 56° C ausgeschaltet wird. Unsere Versuche mit inaktiviertem Serum führten zu dem gleichen Ergebnis.



Kurve 13

Methodisch wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: In einem Ansatz I wurden 10 ccm einer Acetylcholinlösung 1 : 1000 nach Zusatz von 1 ccm durch Erhitzen auf 56° C inaktiviertem Kaninchenserum eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und danach mit 1 ccm einer Physostigminlösung 1 : 500 versetzt. Mit dem Ansatz II wurde ebenso verfahren, das Physostigmin aber sofort zugesetzt und ebenfalls 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Beiden Ansätzen wurde

[9]) O. Loewi, Die Naturwissenschaften. 14. Jg. 194. (1926).

Physostigmin deshalb zugesetzt, um den Einfluß anderer Serumfaktoren auf die Acetylcholinspaltung festzustellen und nach beendeter Einwirkung des Serums eine weitere Zersetzung des Acetylcholins zu verhindern.

Die Untersuchungen ergaben, daß Inaktivierung des Serums die acetylcholinspaltende Wirkung weitgehend, aber nicht vollkommen aufhebt. Der Rest des acetylcholinspaltenden Vermögens wurde durch vorherigen Physostigminzusatz gehemmt. Der Ansatz I mit nachträglichem Physostigminzusatz war meist weniger wirksam als Ansatz II (Kurve 11/12 und 13/14). Daraus ergibt sich demnach:



Kurve 14

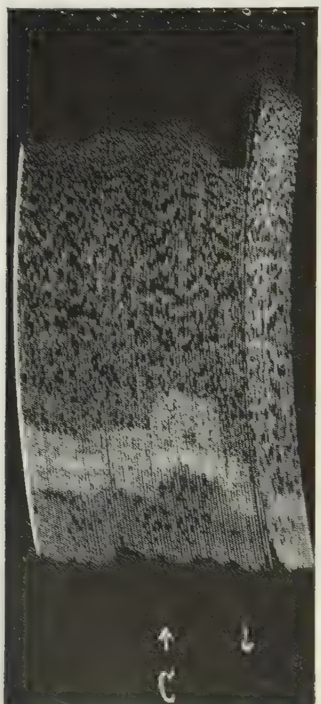
Die acetylcholinspaltende Wirkung des Kaninchenserums wird durch Inaktivierung des Serums zum größten Teil ausgeschaltet. Inaktiviertes Serum hat häufig noch eine acetylcholinspaltende Wirkung.

III.

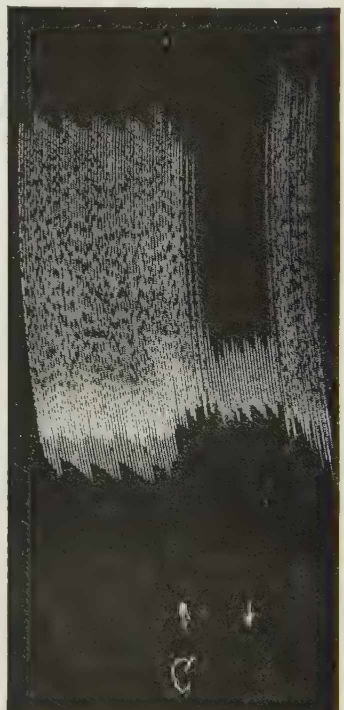
Da die Annahme nahe lag, daß die acetylcholinspaltende Wirkung des inaktivierten Serums auf einer Alkaliwirkung beruht, wurden Alkalispaltungsversuche mit und ohne Physostigminzusatz vorgenommen.

10 ccm einer Acetylcholinbildung 1 : 1000 wurde in einem Ansatz I mit 1 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH versetzt und nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit $\frac{n}{10}$ HCl genau neutralisiert. Außerdem wurde zu evtl. Hemmung weitere Acetylcholinspaltung und zur Schaffung gleicher Versuchsbedingungen 1 ccm einer Physostigminlösung 1 : 1000 zugesetzt. In einem Ansatz II wurden 10 ccm Acetylcholinlösung 1 : 1000 sofort mit 1 ccm Physostigminlösung 1 : 1000 versetzt, mit 1 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH alkalisiert und nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit $\frac{n}{10}$ HCl neutralisiert. Beide Ansätze wurden mit Kaltblüterringer in geeigneter Weise verdünnt und am Froschherz auf Wirksamkeit untersucht.

In jedem Fall wirkte der durch Physostigmin „geschützte" Ansatz II stärker als Ansatz I (Kurve 15—24).



Kurve 19



Kurve 20

Physostigmin schützt also nicht nur gegen die acetylcholinspaltende Wirkung von Serum und Gewebe, sondern in fermentfreier Lösung

auch gegen die Alkalihydrolyse. Diese Feststellung weist darauf hin, daß der Ansatzpunkt des Physostigmins wahrscheinlich nicht das Ferment, sondern das Acetylcholinmolekül ist.

IV.

Welcher Natur das acetylcholinspaltende Ferment des Serums oder Gewebssaftes ist, läßt sich aus den bekannten Befunden nicht entnehmen. Loewi spricht nur allgemein von einer Esterase. Wir haben deshalb untersucht, ob diese Esterase zu dem Fermentkomplex gehört, der durch Monobromessigsäure beeinflußt wird.

Wieder wurden 10 ccm einer Acetylcholinlösung 1 : 1000 in einem Ansatz I mit 1 ccm frischem Kaninchenserum vermischt, und nach einstündigem Stehen mit 2 ccm einer $\frac{m}{100}$ Lösung von monobromessigsaurem Natrium versetzt. In Ansatz II wurden die 10 ccm Acetylcholinlösung 1 : 1000 sofort mit 2 ccm einer Lösung von $\frac{m}{100}$ monobromessigsaurem Natrium und dann mit 1 ccm frischem Kaninchenserum vermischt und 1 Stunde stehen gelassen. Beide Ansätze wurden in geeigneten Verdünnungen am Froschherzen untersucht.

Wie aus den Kurven 25—32 hervorgeht, hat die Monobromessigsäure keinerlei Schutzwirkung gegenüber der acetylcholinspaltenden Wirkung des Serums.



Kurve 31



Kurve 32

V.

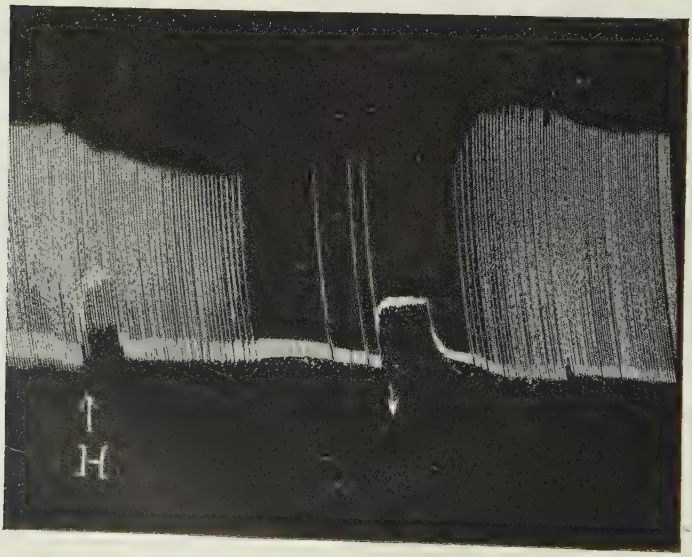
Um endlich festzustellen, ob die Physostigminwirkung wirklich spezifisch für Acetylcholin ist, wurden eine Reihe von Substanzen am isolierten Froschherzen mit und ohne Physostigminvorbehandlung untersucht.



Kurve 33



Kurve 34

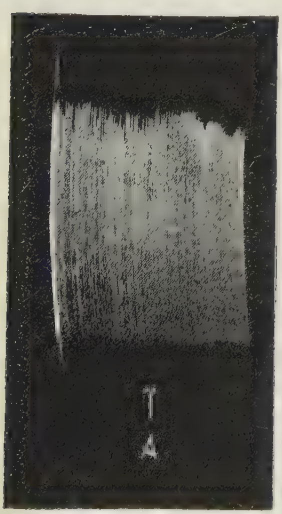


Kurve 35

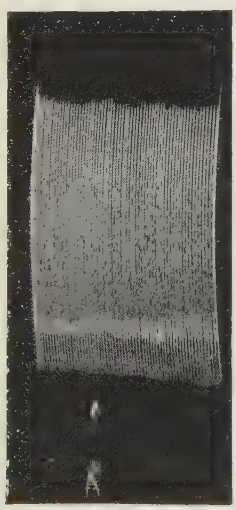
Zunächst interessierte das Verhalten des Lentins, das chemisch den Carbaminsäureester des Cholins darstellt. Nach Kreitmair[10]) und Nöll[11]) ist Lentin eine sehr beständige Verbindung, die sich längere Zeit im lebenden Organismus hält, also weitgehend alkali- und esterase-beständig sein muß.

Wurde eine Mischung von Lentin und Physostigmin in Konzentrationen, die für sich allein keine oder eben angedeutete Wirkung haben, am isolierten Froschherzen untersucht, so trat in jedem Falle eine wesentliche Verstärkung der Giftwirkung auf (Kurve 33—38). Das Froschherz wurde also durch Physostigmin für Lentin sensibilisiert. Um eine Schutzwirkung gegen Alkali- oder Esterasespaltung kann es sich bei der Beständigkeit des Lentins nicht handeln. Der Angriffspunkt muß bei dieser sensibilisierenden Wirkung am Testobjekt selbst gesucht werden.

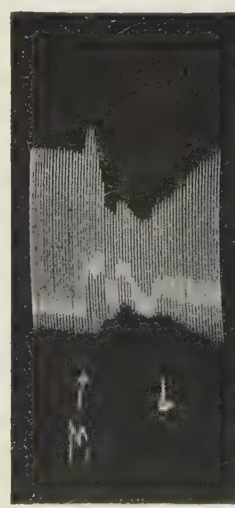
Dieselbe Wirkung des Physostigmins konnte auch für Muskarin nachgewiesen werden (Kurve 39—44). Unwirksame oder schwach wirksame Muskarinkonzentrationen wurden durch Beimischung unwirksamer Physostigminmengen stark giftig für das Froschherz. Auch diese Wirkung kann ihren Angriffspunkt nur am Testobjekt selbst haben.



Kurve 42



Kurve 43



Kurve 44

Die Lentin- und Muskarinversuche zeigen, daß die Physostigminwirkung nicht nur auf Acetylcholin beschränkt ist. Damit stimmt der

10) H. Kreitmair, Arch. exp. Pathol. **164**, 346, (1932).
11) H. Nöll, Arch. exp. Pathol. **167**, 158 (1932).

bereits erwähnte Befund von Feldberg und Rosenfeld[12]) überein, daß Physostigmin das Blutegelpräparat für Cholin sensibilisiert. Eine ähnliche Sensibilisierung durch Physostigmin haben Chang und Gaddum[13]) am Froschrektuspräparat für eine ganze Reihe von Cholinestern festgestellt.

Die Wirkungsverstärkung durch Physostigmin ist jedoch nicht auf parasympathisch erregende Stoffe beschränkt. Denn die Histaminwirkung wurde, wie aus den Kurven 45—53 hervorgeht, am isolierten Froschherzen ebenfalls durch Physostigmin verstärkt.

VI.

Nach den vorliegenden Befunden beruht die Acetylcholinspaltung durch Serum nicht auf einer Inaktivierung des spaltenden Fermentes, sondern wie die Physostigminhemmung der Acetylcholinspaltung durch esterasefreies Alkalin zeigt, auf einer Schutzwirkung, die am Acetylcholinmolekül angreift.

Die Wirkungsverstärkung durch Physostigmin ist nicht spezifisch für Acetylcholin, sondern tritt auch auf gegenüber den parasympathisch erregenden Stoffen Lentin und Muskarin. Nach Feldberg und Rosenfeld[14]) und nach Chang und Gaddum[15]) wird die Wirkung von Cholin und einer Reihe von Cholinestern durch Physostigmin ebenfalls verstärkt. Da hierbei eine Schutzwirkung gegenüber Esterase- und Alkalispaltung nicht stattfindet, so muß dem Physostigmin eine direkte sensibilisierende Wirkung am Testobjekt selbst zukommen.

Die sensibilisierende Wirkung des Physostigmins ist nicht charakteristisch für parasympathisch erregende Stoffe, — Cholin, Acetycholin, Lentin, andere Cholinester, Muskarin — sondern macht sich auch gegenüber Histamin geltend. Auch dieser Befund weist auf eine direkte Wirkung des Physostigmins am Testobjekt hin. Auf gleiche Weise erklären sich die Befunde anderer Autoren[16]) über die Physostigminsensibilisierung des Blutegelpräparates für den R-Stoff und für Kaliumionen.

Beim Nachweis kleiner Acetylcholinmengen in Organextrakten am biologischen Objekt wird diese sensibilisierende Wirkung des Physostigmins künftig mehr beachtet werden müssen.

---

[12]) W. Feldberg u. P. Rosenfeld, Pflügers Arch. **232**, 212, (1933).
[13]) H. C. Chang u. J. H. Gaddum, Journ. of Physiol. **79**, 255, (1933).
[14]) W. Feldberg u. P. Rosenfeld, Pflügers Arch. **232**, 212, (1933).
[15]) H. C. Chang u. J. H. Gaddum, Journ. of Physiol. **79**, 255 (1933).
[16]) H. C. Chang und J. H. Gaddun ebenda. Kl. Gollwitzer-Meier, Arch. exp. Pathol. **176**, 642, (1934).



Kurve 48



Kurve 49



Kurve 50

Kurventexte.

Kurve	1:	Acetylcholin-Serum:	A = Ansatz I mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	2:	" "	A_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	3:	" "	B = Ansatz I mit Acetylcholin 1:500 Millionen
"	4:	" "	B_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:500 Millionen
"	5:	" "	C = Ansatz I mit Acetylcholin 1:10 Millionen
"	6:	" "	C_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:10 Millionen
"	7:	" "	A = Ansatz I mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	8:	" "	A_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	9:	" "	B = Ansatz I mit Acetylcholin 1:100 Millionen
"	10:	" "	B_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:100 Millionen

"	11:	Acetylcholin-inaktiviertes Serum	A = Ansatz I mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	12:	" "	A_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	13:	" "	B = Ansatz I mit Acetylcholin 1:100 Millionen
"	14:	" "	B_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:100 Millionen

"	15:	Acetylcholin-Alkali:	A = Ansatz I mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	16:	" "	A_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	17:	" "	B = Ansatz I mit Acetylcholin 1:100 Millionen
"	18:	" "	B_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:100 Millionen
"	19:	" "	C = Ansatz I mit Acetylcholin 1:500 Millionen
"	20:	" "	C_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:500 Millionen
"	21:	" "	D = Ansatz I mit Acetylcholin 1:200 Millionen
"	22:	" "	D_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:200 Millionen
"	23:	" "	E = Ansatz I mit Acetylcholin 1:50 Millionen
"	24:	" "	E_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:50 Millionen

"	25:	Acetylcholin-Monobromessigsäure	A = Ansatz I mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	26:	" "	A_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:1 Milliarde
"	27:	" "	B = Ansatz I mit Acetylcholin 1:100 Millionen
"	28:	" "	B_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:100 Millionen
"	29:	" "	C = Ansatz I mit Acetylcholin 1:500 Millionen
"	30:	" "	C_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:500 Millionen
"	31:	" "	D = Ansatz I mit Acetylcholin 1:300 Millionen
"	32:	" "	D_1 = Ansatz II mit Acetylcholin 1:300 Millionen

Kurve 33: E = Lentin 1:50 Millionen
„ 34: A_1 = Physostigmin 1:5 Millionen
„ 35: H = Lentin 1:50 Millionen + Physostigmin 1:5 Millionen

„ 36: E = Lentin 1:10 Millionen
„ 37: B_1 = Physostigmin 1:2 Millionen
„ 38: L = Lentin 1:10 Millionen + Physostigmin 1:2 Millionen

„ 39: F = Physostigmin 1:500 000
„ 40: D = Muskarin 1:400 000
„ 41: H = Physostigmin 1:500 000 + Muskarin 1:400 000

„ 42: A = Muskarin 1:1 Millionen
„ 43: K = Physostigmin 1:50 000
„ 44: M = Muskarin 1:1 Millionen + Physostigmin 1:50 000

„ 45: B und C = Histamin 1:10 Millionen
„ 46: G = Physostigmin 1:500 000
„ 47: I = Histamin 1:10 Millionen + Physostigmin 1:500 000

„ 48: A = Histamin 1:10 Millionen
„ 49: G = Physostigmin 1:250 Millionen
„ 50: H = Histamin 1:10 Millionen + Physostigmin 1:250 Millionen

„ 51: C und D = Histamin 1:50 Millionen
„ 52: H = Physostigmin 1:20 Millionen
„ 53: I = Histamin 1:50 Millionen + Physostigmin 1:20 Millionen.

Zum Schluß möchte ich es nicht versäumen, Herrn Professor Dr. Zipf in Königsberg und Herrn Professor Dr. Freund in Münster für die gütige Ueberlassung des Themas, sowie für die Anleitung und Unterstützung, die sie mir gewährten, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Ludger Josef Müller, wurde am 6. Oktober 1910 zu Emsdetten in Westfalen als Sohn des Kaufmanns Heinrich Müller und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Lintel, geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und Rektoratschule, im Anschluß dann 4 Jahre das Gymnasium in Rheine, an dem ich 1929 die Reifeprüfung bestand. Meine medizinischen Studien begann ich in Freiburg im Breisgau. Im Sommer 1931 bestand ich in Münster das Physikum. Die klinischen Semester verbrachte ich in Graz und Münster, wo ich im Dezember 1934 meine Studien mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.